

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Pavel Dvořák

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ CHLORPROMAZINU
POMOCÍ VSÁDKOVÉ INJEKČNÍ ANALÝZY

Electrochemical Determination of Chlorpromazine Using Batch
Injection Analysis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité zdroje informací a literaturu. Tato práce, ani její žádná část, nebyla nikdy předložena pro získání jiného, či stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 21. května 2018

Tato bakalářská práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt GAČR P206/12/G151).

Poděkování

V úvodu bych chtěl poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za vedení a cenné připomínky k mé práci, dále také celému kolektivu laboratoře č. 113 za veškerou pomoc a ochotu.

Mé poděkování také patří mým rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole a bez jejichž pomoci bych se nedostal dále než přes první semestr. Také bych rád poděkoval svým přátelům za celkovou podporu a motivaci při studiu.

Klíčová slova

elektrochemie

ampérometrie

vsádková injekční analýza

chlorpromazin

sítotisková uhlíková elektroda

analýza léčiv

Key words

Electrochemistry

Amperometry

Batch Injection Analysis

Chlorpromazine

Screen-Printed Carbon Electrode

Drug Analysis

Abstrakt

Předmětem předkládané bakalářské práce byl vývoj ampérometrické metody a nalezení optimálních podmínek pro stanovení antipsychotika chlorpromazinu pomocí vsádkové injekční analýzy (BIA) se sítotiskovou uhlíkovou elektrodou.

V první části práce byla ověřena možnost použití této moderní techniky (BIA s ampérometrickou detekcí) při stanovení modelové látky – hexakynoželeznatanu draselného. Zkoumány a optimalizovány byly následující parametry: detekční potenciál, rychlost dávkování a dávkovaný objem. Při zvolených optimálních podmínkách (detekční potenciál 800 mV, rychlost dávkování 5 a dávkovaný objem 40 μ l) byla proměřena kalibrační závislost v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l až $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, s dosaženou mezí stanovitelnosti 7,2 μ mol/l.

V druhé části této práce byly hledány optimálních podmínky pro stanovení chlorpromazinu. Hledáno bylo optimální pH prostředí pro stanovení, které bylo proměřeno v rozmezí hodnot pH 2-12 (realizováno pomocí Brittonova-Robinsonova pufru), a optimální detekční potenciál, rychlost dávkování a dávkovaný objem. Při nalezených optimálních podmínkách (pH 6, detekční potenciál 700 mV, rychlost dávkování 6 a dávkovaný objem 50 μ l) byla proměřena kalibrační závislost v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l až $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l, s dosaženou mezí stanovitelnosti 2,7 μ mol/l.

Aplikovatelnost nově vyvinuté metody stanovení byla ověřena při stanovení obsahu chlorpromazinu v přípravku Plegomazin.

Abstract

The aim of the presented Bachelor Thesis was to develop a new amperometric method and to find optimal conditions for the determination of an antipsychotic drug chlorpromazine using a batch injection analysis (BIA) with a screen-printed carbon electrode.

In first part of this work, the applicability of this modern technique (BIA with amperometric detection) was verified at the determination of a model compound – potassium ferrocyanide. Following parameters were investigated and optimized: potential of detection, rate of dispense and volume of dispense. Under the optimal conditions (detection potential of 800 mV, dispense rate of 5, and dispense volume of 40 μl), the calibration dependence was measured in the concentration range from $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l to $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l. The limit of quantification was 7.2 $\mu\text{mol/l}$.

In second part of this work, optimal conditions for the determination of chlorpromazine were sought. The optimized parameters were as follows: pH of the medium for the determination, which was investigated in the pH range from 2 to 12 (realized using a Britton-Robinson buffer), potential of detection, rate of dispense, and volume of dispense. Under the optimal conditions (pH of 6, detection potential of 800 mV, dispense rate of 6, and dispense volume of 50 μl), the calibration dependence was measured in the concentration range from $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l to $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l. The limit of quantification was 2.7 $\mu\text{mol/l}$.

The applicability of this newly developed method was verified on the determination of chlorpromazine in a pharmaceutical formulation Plegomazin.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Cíl práce	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Vsádková injekční analýza	10
2.1.1 Princip metody	10
2.1.2 Možnosti detekce.....	12
2.2 Chlorpromazin.....	14
2.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti	16
2.2.2 Mechanismus účinku.....	17
2.2.3 Způsoby stanovení.....	17
2.2.4 Přípravek Plegomazin	20
3 Experimentální část	21
3.1 Reagencie	21
3.2 Instrumentace	21
3.3 Vyhodnocení dat	22
3.4 Výpočet mezi stanovitelnosti	22
3.5 Výpočet výtěžnosti.....	22
4 Stanovení hexakynoželeznatanu draselného	23
4.1 Výběr vhodných podmínek pro stanovení	23
4.2 Kalibrační závislost	24
5 Stanovení chlorpromazinu.....	26
5.1 Výběr vhodných podmínek pro stanovení	26
5.2 Kalibrační závislost	28
5.3 Stanovení chlorpromazinu v přípravku Plegomazin	30
6 Závěr.....	32
7 Použitá literatura	33

Seznam zkratek

A	absorbance
A_p	plocha píku (V s)
BIA	vsádková injekční analýza
BR	Brittonův-Robinsonův pufr
CPE	uhlíková pastová elektroda
DPV	diferenční pulzní voltametrie
DPSV	diferenční pulzní rozpouštěcí voltametrie
E	potenciál (V)
FIA	průtoková injekční analýza
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
I_p	procházející proud v maximu píku (V)
LOQ	mez stanovitelnosti
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R^2	koeficient determinace
SCE	sítotisková uhlíková elektroda
UV-VIS	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je vývoj ampérometrické metody pro stanovení antipsychotika chlorpromazinu pomocí vsádkové injekční analýzy (BIA) se sítotiskovou uhlíkovou elektrodou. Nejprve byla ověřena možnost použití této techniky (BIA s ampérometrickou detekcí) při stanovení hexakynoželeznatanu draselného. Poté byla vyvinuta metoda pro stanovení chlorpromazinu. V závěru této práce byla stanovena koncentrace chlorpromazinu v přípravku Plegomazin.

2 Teoretická část

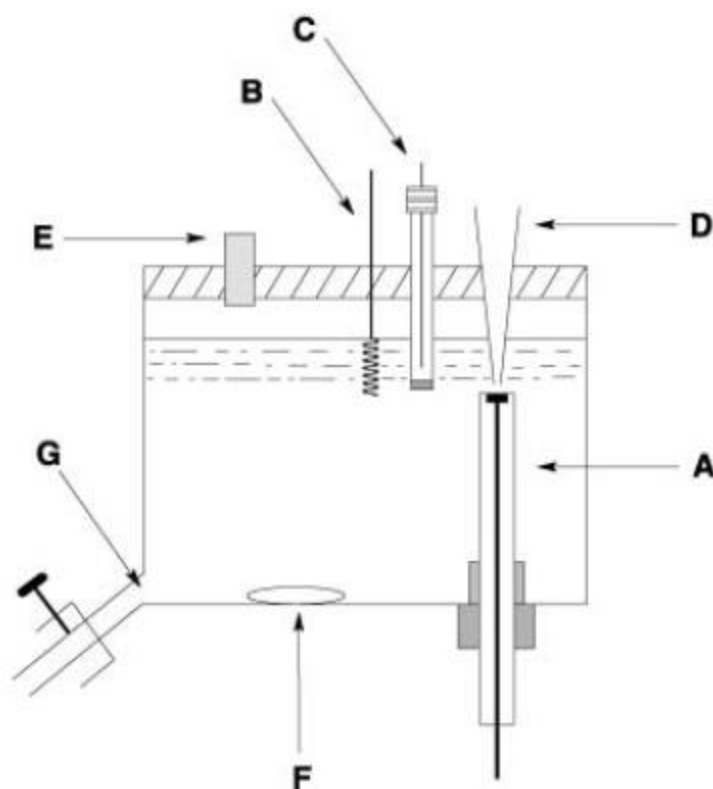
2.1 Vsádková injekční analýza

Trendem v analytické chemii je v posledních letech vývoj automatizovaných systémů, které pracují s vysokou rychlostí, dokáží analyzovat velký počet vzorků a jejichž analytické výsledky jsou přesné a reprodukovatelné. V tomto ohledu se během 80. a 90. let minulého století stala velmi populární průtoková injekční analýza (z angl. Flow Injection Analysis, FIA), jejímž principem je nástřik malého objemu vzorku do nosného média, které unáší zónu vzorku k detektoru. Tato technika našla širokou škálu uplatnění, ať se jedná o analýzu enviromentálních, průmyslových vzorků či farmaceutických preparátů, neboť poskytuje možnost univerzálního použití, vysokou přesnost a reprodukovatelnost.

V roce 1991 pánové Wang a Taha [1] uvedli novou techniku, kterou nazvali vsádková injekční analýza (z angl. Batch Injection Analysis, BIA), která představuje alternativu pro velmi rychlá stanovení, ke kterým je potřeba jen malý objem vzorku. Podstatou této analytické techniky je dávkování vzorku ze špičky automatické mikropipety přímo k detektoru, který je ponořen ve velkém objemu blanku. Tato technika vykazuje velmi podobné vlastnosti jako již zmiňovaná průtoková injekční analýza, zvláště co se týče citlivosti, rychlosti stanovení, objemu vzorku a reprodukovatelnosti stanovení. Oproti této technice ale poskytuje i výhody, jako například odstranění problémů s používáním pump či úplnou eliminaci spotřeby nosného média.

2.1.1 Princip metody

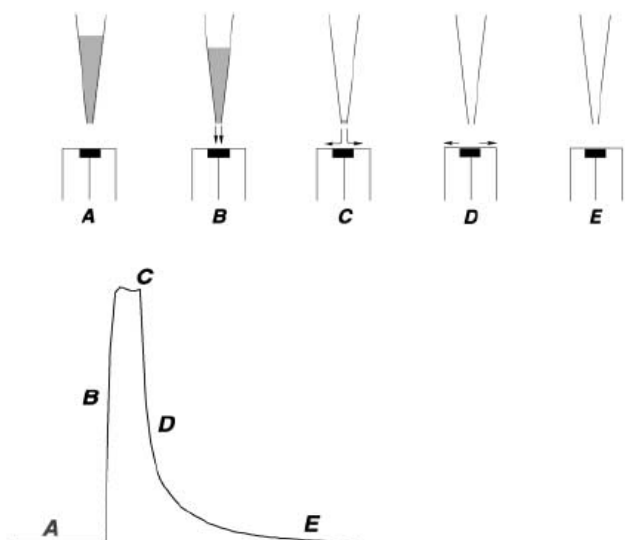
První BIA sestava, kterou vytvořili pánové Wang a Taha [1], využívala ampérometrickou detekci. Cella, zobrazena na obr. 2.1, je vyrobená z plexiskla. Pracovní elektroda (A) je vložena skrze předem vyvrtaný otvor zespodu. Špička pipety (D) je vložena skrze otvor přímo nad pracovní elektrodu. Pipeta je k sestavě připevněna pomocí držáku se svorkou, která zaručuje umístění na stejné místo vždy při každém novém dávkování. V dalších dvou otvorech je vložena elektroda referentní (C) a pomocná (B). Místo (E) je určeno k nalití roztoku blanku. Dále je přítomno míchadlo (F) a místo pro odtok (G).



Obrázek 2.1 – Schematické znázornění velkoobjemové BIA cely; A – pracovní elektroda, B – pomocná elektroda, C – referentní elektroda, D – špička pipety, E – otvor, F – míchadlo, G – odtok; převzato z [1]

Podstatou BIA je dávkování vzorku o objemu několika mikrolitrů přímo k povrchu detektoru. Při tomto dávkování se vytvoří zóna, která se rozptýlí při své cestě k detektoru s reprodukováným způsobem transportu a kontrolovaným rozptylem v místě i čase. Výsledkem je odezva detektoru ve formě píku s následujícím velmi rychlým návratem signálu na základní linii. Jednotlivé kroky v dávkování jsou popsány na obr. 2.2. Během prvních pokusů byla používána manuální automatická pipeta, reprodukovatelnost analytických výsledků byla silně ovlivněna zkušeností dávkujícího pracovníka. Po uvedení automatických, počítačem programovatelných pipet na trh se tento problém eliminoval a k používání této metody již není potřeba velkých zkušeností s reprodukovatelným dávkováním. Hlavním důvodem úspěchu BIA je kombinace následujících dvou faktorů. Prvním je hydrodynamický princip „wall-jet“ nástřiku vzorku k povrchu a druhým je významné zředění dávkovaného vzorku. První cely vyvinuté pro tuto metodu měly objem 250-700 ml, tudíž vzorek byl zředěn více jak $10\,000\times$. Cely, které poté byly vyvíjeny dále, mají již menší objem. Potřebnou nutností je míchání roztoku. Tyto mladší cely mají již objem jen pár mililitrů, ne-li mikrolitrů [3]. Cely o malém objemu představují velké výhody ve smyslu významné redukce potřebných chemikálií spojené s ochranou obsluhujících pracovníků, ale také možnosti užívat tuto

soupravu jako přenosnou pro možnost stanovení *in situ*. Stačí mít elektronickou pipetu, celu, přenosný potenciostat a přenosný počítač pro záznam signálu [2,4].



Obrázek 1.2 – Jednotlivé kroky v BIA; A – před dávkováním, B – během dávkování, C – ukončení dávkování, D – vymývání, E – úplné vymytí; převzato a upraveno z [2]

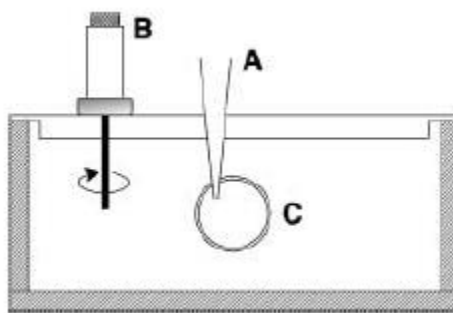
2.1.2 Možnosti detekce

Fluorimetrie

Jednou z možností detekce v rámci užívání vsádkové injekční analýzy je fluorescenční detektor. Je nutné užívat BIA cely, kde optické vlákno ústí přímo ke konci špičky pipety. Tento senzor byl sestaven uzavřením skleněných vláken do skleněné trubičky epoxidovou pryskyřicí, přičemž jedno vlákno slouží k excitaci, zatímco druhé slouží k detekci fluorescence. Pro tento způsob je nutné užívat větší velikosti vzorků, alespoň 25 μl . Problémem u detekce tohoto typu může být samoabsorpce analytu [5].

Spektrofotometrie

BIA může být také kombinována se spektrofotometrickou detekcí. K tomu je zapotřebí ke stěně velkoobjemové pracovní cely s roztokem blanku připojit spektrofotometr. Optická dráha paprsku je definována vzdáleností stěn cely, znázorněna na obr. 2.3. Proces analýzy musí probíhat ve velkém objemu blanku a při míchání. Tento způsob detekce se vyznačuje dobře definovanými píky s rychlým nárůstem absorbance a poté jejím poklesnutím způsobeným rychlým průchodem zóny vzorku. Nejlepších výsledků je dosaženo při pomalejším dávkování. Alternativní cestou je přidání reagentu, který vytvoří s analytem barevný produkt, aby se předešlo nežádoucímu vlivu na základní linii při mnoha přidávcích vzorků [6].



Obrázek 2.2 – Znázornění BIA cely se spektrofotometrickou detekcí; A – špička pipety, B – míchadlo, C – optické okno; převzato z [2]

Potenciometrie

Potenciometrie jako detekční technika při BIA je velmi vhodná pro stanovení iontů pomocí iontově selektivních elektrod, zejména kvůli její vysoké selektivitě. Samotná BIA cela je velmi podobná té, která je zobrazená na obr. 2.1, s rozdílem, že místo pracovní elektrody je zde elektroda iontově selektivní. Nevýhodou je však akumulace analytu na elektrodě při opakovaném měření. Tomuto však lze předejít volbou vhodného základního elektrolytu. Byly již vyvinuty metody pro stanovení sodných a draselných iontů v minerálních vodách [7], pro stanovení kyseliny acetylsalicylové [8] v tabletách či pro stanovení iontů rtuti [9].

Voltametrie

V literatuře [10] bylo popsáno užití cyklické voltametrie a square-wave voltametrie jako detekčních technik pro BIA při stanovení hexakynoželeznatanu draselného jako modelové látky.

Dále bylo také popsáno využití anodické rozpouštěcí voltametrie pro stanovení stopových množství iontů kovů [11]. Tato operace se sestává ze dvou kroků. Prvním, při kterém dochází ke kumulaci redukované formy analytu na elektrodu, je dávkování malého objemu vzorku poblíže rtuťové filmové elektrody (která je ponořena v roztoku blanku) po krátkou dobu. Druhým krokem je rozpouštění redukované formy analytu prostřednictvím vkládání rychlých „square-wave“ pulzů. Tento systém je charakterizován vysokou citlivostí, jednoduchostí, minimalizuje problém s rozpuštěným kyslíkem a zároveň redukuje celkový čas analýzy.

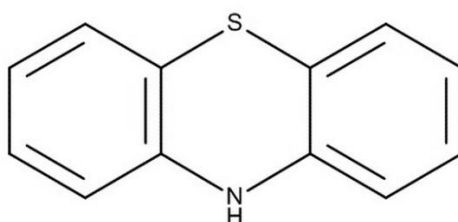
Ampérometrie

Největší pozornosti se zatím dostalo ampérometrické detekci, a to z důvodu, že odezva detektoru má tvar píku a lze ji nejjednodušeji vyhodnotit. Jako nejlepší vzdálenost špičky pipety od detektoru byly vybrány cca 2 mm, neboť při menší vzdálenosti procházející proud

ještě není patrný a při vzdálenosti větší se signál ztrácí [12]. Jednou z výhod ampérometrické detekce je, že lze užít vzorků bez přidaného základního elektrolytu. Vzorky musí být dávkovány přímo a rychle na povrch detektoru (s maximálním objemem 100 µl). Nevýhodou tohoto případu může být zúžení potenciálového okna pro redoxní reakce z důvodu ohmické polarizace. Užitím elektrod modifikovaných methylenovou modří lze stanovit hemoglobin přímo v lidské krvi. Výsledky této metody velmi dobře korelují s výsledky oficiální spektrofotometrické metody pro stanovení hemoglobinu [13].

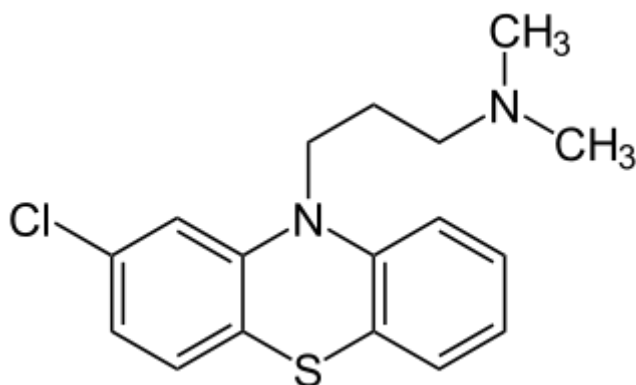
Zajímavostí je, že BIA s ampérometrickou detekcí je možné použít i při stanovení více analytů vedle sebe na jedné pracovní elektrodě. Konkrétně se jedná například o stanovení paracetamolu a kofeinu [14]. Nejprve je vložen potenciál, při kterém dochází k redukci či oxidaci prvního z analytů. Poté je vložen druhý, při kterém dochází ke konverzi obou analytů. Pomocí přepočítávacího faktoru tak lze stanovit oba analyty ve své směsi s reprodukovatelnými a přesnými výsledky.

2.2 Chlorpromazin



Obrázek 2.3 – Strukturní vzorec fenothiazinu [15]

Chlorpromazin patří mezi fenothiazinové deriváty (obr. 2.4), což jsou synteticky připravené heterocyklické sloučeniny, které mají atom síry v poloze 5 a atom dusíku v poloze 10. Původně byly fenothiaziny syntetizovány jako anthelminitika. S přihlédnutím k jejich nízké toxicitě, širokému farmakologickému účinku a jejich vysoké fyziologické aktivitě jsou používány v rozmanitém spektru jako psychofarmaka, antihistaminika a antiparkinsonika. K jejich nejvýznamnější vlastnosti patří zejména antidepresivní účinek. Mezi nejběžnější nežádoucí účinky při léčbě fenothiaziny patří útlum, závratě, rozmazané vidění, nevolnost, zvracení, průjem či zácpa, poruchy trávení, sucho v ústech a překrvení nosní sliznice [16].



Obrázek 2.4- Strukturní vzorec chlorpromazinu [17]

Chlorpromazin (strukturní vzorec uveden na obr. 2.5), systematicky 3-(2-chlor-10*H*-fenothiazin-10-yl)-*N,N*-dimethylpropan-1-amin, je významnou sloučeninou ze skupiny fenothiazinových léčiv. Poprvé byl připraven roku 1950 a od roku 1954 se začal užívat k léčbě schizofrenie. Původně byl vyvinut jako antihistaminikum proti alergii. Vykazuje významné adrenolytické, anticholinergní, hypotenzní, spasmolytické, hypotermické, anestetické, antiemetické a antihistaminické účinky. Významně tlumí centrální nervový systém a zvyšuje účinek hypnotik a narkotik. Používá se zejména v psychiatrii k léčbě schizofrenie, stavů psychomotorického neklidu, halucinací, některých úzkostí a obsedantních neuróz.

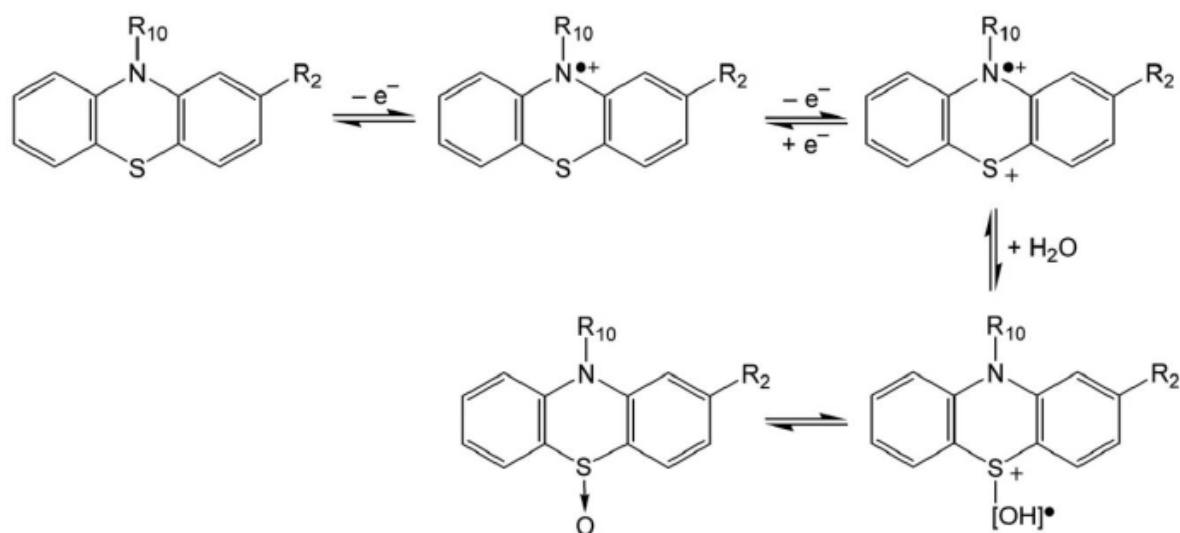
Terapeuticky používaný chlorpromazin hydrochlorid je bílý nebo krémově bílý prášek, který je velmi citlivý na světlo. Je dobře rozpustný ve vodě, ethanolu a chloroformu. Disociační konstanta $pK_a = 9,3$, rozdělovací koeficient $\log P = 3,4$.

Chlorpromazin hydrochlorid může být podáván intravenózně a perorálně. Při perorálním podání je dobře absorbován (podléhá však „first-pass“ efektu v játrech a střevní stěně, biologická dostupnost se pohybuje mezi 20 a 30 %), maximální plasmatické koncentrace je dosaženo za 2-4 hodiny. Je metabolizován v játrech, za vzniku sulfoxidových derivátů, dále byla zjištěna *N*-demethylace, hydroxylace a *N*-oxidace. Ve druhé fázi biotransformace byla zjištěna konjugace s kyselinou glukoronovou. Biologický poločas je 7-120 hodin. Vylučování je především do moči (až 70 % přijaté dávky), částečně i do žluče. Chlorpromazin má velký distribuční objem (asi 21 litrů) a prochází i hematoencefalickou bariérou, proto jsou jeho metabolity vylučovány i po mnoha měsících od podání. Terapeuticky se denní dávka pohybuje v rozmezí 75-1000 mg chlorpromazinu hydrochloridu [16].

2.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Chlorpromazin se vyskytuje buď ve formě volné báze, anebo jako sůl – hydrochlorid. Ve formě volné báze vykazuje podobu žluté olejové kapaliny, která je omezeně rozpustná ve vodě. Sůl je naopak bílá krystalická látka velmi dobře rozpustná ve vodě, zředěné kyselině chlorovodíkové, ethanolu, chloroformu, hůře rozpustná v acetonu. Sůl disociuje a reaguje jako velmi slabá kyselina $pK_a \approx 9$. Fenothiazin vykazuje teplotní stabilitu do 100 °C. Substituce zvyšuje tepelnou stabilitu sloučeniny, která je v teplotním rozsahu 150-250 °C.

Velmi významnou vlastností, jíž se obecně deriváty fenothiazinů vyznačují, je jejich schopnost se oxidovat. Ať jde o chemická oxidační činidla, enzymy, elektrochemickou či fotochemickou oxidaci. Vzniká poté stabilní barevný radikál s dlouhou dobou života. Mechanismus oxidace je znázorněn na obr. 2.6. V prvním kroku je molekula oxidována na barevný volný radikál. Tato reakce je reverzibilní. Ve druhém kroku je radikál-kationt ireverzibilně oxidován (ztrátou dalšího elektronu) a je vytvořen fenothiazinový iont. Tento iont je následně snadno hydrolyzován, což vede ke vzniku bezbarvého sulfoxidového derivátu. Rychlost prvního reakčního kroku závisí na druhu oxidačního činidla, kyselosti roztoku, teplotě a typu derivátu. Předpokládá se, že rychlost druhého kroku silně závisí na rychlosti následné hydrolýzy. Oxidace fenothiazinu a jeho derivátů probíhají při relativně nízkých redoxních potenciálech [16].



Obrázek 2.6 – Mechanismus oxidace derivátů fenothiazinu; převzato z [18]

2.2.2 Mechanismus účinku

Základním mechanismem účinku antipsychotických léčiv je blokáda dopaminových D_2 receptorů. Byla nalezena jednoznačná korelace mezi klinickým účinkem antipsychotik a jejich afinitou k D_2 receptorům. Dále je také pro vybraná antipsychotika charakteristická silná vazba na serotoninové 5-HT₂ receptory. Vazba k těmto receptorům výrazně napomáhá při zvládnutí negativních příznaků schizofrenie a vede k redukci extrapyramidových vedlejších účinků. Žádná skupina látek však není zcela ideální, což je způsobeno ovlivněním i dalších receptorových systémů či zásahem dopaminových nebo serotoninových receptorů i v jiných oblastech, než jsou požadovány. Jako příklad vedlejších efektů je možno uvést účinky po blokáde dopaminových receptorů (extrapyramidové účinky, zvýšená prolaktémie, antiemetický efekt), androgenních receptorů (pokles libida, apatie, zvýšení chuti k jídlu, vzestup hmotnosti, ortostatická hypotenze), histaminových receptorů (sedace, apatie) nebo muskarinových receptorů (kognitivní deficit, zácpa, potíže s močením). Ne vždy jsou vedlejší efekty vyloženě nežádoucí. V terapii lze využít kupříkladu antiemetického účinku starších antipsychotik ke zvládnutí všech forem nauzey a zvracení nebo jejich zklidňujícího účinku [19].

2.2.3 Způsoby stanovení

Stanovení a důkazy chlorpromazinu lékopisnými metodami

První lékopisnou metodou, díky které lze stanovit chlorpromazin, je acidobazická titrace. 0,250 g lékové formy se rozpustí ve směsi 5 ml 0,01 mol/l kyseliny chlorovodíkové a 50 ml 96 % ethanolu a titruje se 0,1 mol/l hydroxidem sodným za potenciometrické indikace bodu ekvivalence. Spotřeba hydroxidu sodného se odečte mezi dvěma inflexními body [20].

Mezi důkazové metody patří spektrofotometrie. Roztok je třeba připravit a za ochrany před slunečním světlem se měří absorbance hned po přípravě. 50 mg lékové formy se rozpustí v 0,1 mol/l kyselině chlorovodíkové a zředí se na 500 ml. 5 ml tohoto roztoku se zředí stejnou kyselinou na 100 ml a měří se absorbance při 230 až 340 nm. Roztok vykazuje maxima při 254 a 306 nm [20]. Chlorpromazin lze spektrofotometricky i stanovit, například derivační spektrofotometrií. Tato metoda však není lékopisná [21].

Další důkazovou metodou je specifický důkaz chloridových iontů pomocí pevného dichromanu draselného v prostředí kyseliny sírové za vzniku dichloridu chromylu CrO_2Cl_2 („chromylchlorid“), který nevytvářejí bromidy ani chloridy. Uvolněný dichlorid chromylu barví filtrační papír impregnovaný roztokem difenylkarbazidu fialově červeně [22].

Stanovení chlorpromazinu pomocí diferenční pulzní rozpouštěcí voltametrie

Chlorpromazin je možné stanovit pomocí rozpouštěcí voltametrie. Vzorek je potřeba rozpustit v pufru o pH 9 (realizováno s Brittonovým-Robinsonovým pufrem). Na elektrodu ze skelného uhlíku je vložen akumulací potenciál 0 mV po dobu 240 s. Po 10 s odmlky je proměřen proud při měnícím se potenciálu od 0 do 1000 mV (proti argentchloridové referenční elektrodě). Potenciál oxidace chlorpromazinu je 620 mV. Tato metoda vykazuje lineární dynamický rozsah 0,05-1,2 mg/l, lze ji stanovovat i vzorky s biologickou matricí (krev) a je možné ji stanovit i více fenothiazinů ve směsi. Mezi možné interference patří ionty těžkých kovů (Cd^{2+} , Pb^{2+}) či ionty kovů alkalických zemin (Mg^{2+} , Ca^{2+}) [23].

Stanovení chlorpromazinu pomocí FIA

Chlorpromazin lze stanovit i pomocí průtokové injekční analýzy s coulometrickou detekcí. Mezi nosným roztokem je vytvořena membrána z PVC, která odděluje prostor detekční cely. V roztoku i cele je přítomna jak pracovní, tak i referenční elektroda. Vzorek je rozpuštěn v $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l LiCl a dávkován do nosného roztoku tekoucího rychlostí 1 ml/min. Na elektrody je vložen nejprve potenciál o hodnotě 250 mV po dobu 8 s. Poté je potenciál zvýšen na 375 mV po dobu 10 s, nakonec je snížen na 200 mV po dobu 50 s. Množství náboje prošlého při 375 mV koreluje s koncentrací chlorpromazinu. Měření probíhá s korekcí na blank. Tato metoda má lineární dynamický rozsah v oblasti koncentrací od 10^{-4} mol/l do 10^{-6} mol/l, s limitem detekce $2 \cdot 10^{-7}$ mol/l. Metoda je vhodná pro stanovení v tabletách, ampulích a dokonce i v lidské moči [24].

Stanovení chlorpromazinu pomocí HPLC

Další separační technikou, kterou lze stanovit chlorpromazin, je HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Dělení bylo provedeno na koloně z C18 (50 mm × 4,6 mm, velikost částic 5 μm). Pro gradientovou eluci byla použita směs methanolu a pufru (směs 5 mmol/l kyseliny octové a amoniaku, pH 3,9) a binární pumpa. Počáteční mobilní fáze se skládala z 20 % methanolu a 80 % pufru. Koncentrace methanolu se lineárně zvyšovala až k 70 % methanolu během 4 min. Tato metoda umožňuje stanovit až 48 antidepresiv vedle sebe a je vhodná také pro stanovení v lidském séru [25].

Stanovení chlorpromazinu pomocí diferenční pulzní voltametrie

Pro stanovení chlorpromazinu lze také užít čerstvě vytvořené uhlíkové pastové elektrody dopované nanočásticemi TiO_2 a V_2O_5 . Vzorek je třeba rozpustit a upravit jeho pH na hodnotu 4 (realizováno fosfátovým pufrem). Anodický pík chlorpromazinu je pozorován při potenciálu

0,82 V (proti argentchloridové referentní elektrodě). Tato metoda má lineární dynamický rozsah od $3,3 \cdot 10^{-8}$ mol/l do $8,5 \cdot 10^{-4}$ mol/l, s limitem detekce $5,3 \cdot 10^{-9}$ mol/l. Tuto metodu lze aplikovat i na biologické vzorky (sérum, krev). Metoda je velmi selektivní a v literatuře jsem nedohledal žádné možné interference [26].

Titrační stanovení v nevodném prostředí

Chlorpromazin lze stanovit v lékové formě i titrací, ať se jedná o ampule, tablety či čípky. Tablety je třeba nejdříve rozetřít, odebrat cca 20 mg homogenní látky, rozpustit v 10 ml acetonu a ponechat míchat elektromagnetickým míchadlem. Poté na fritě zfiltrovat nerozpustné složky tablet. K roztoku je přidáno 0,5 ml roztoku octanu rtuťnatého a 3 kapky methylové červeně. Roztok je ztitrován kyselinou chloristou v dioxanu z oranžového zbarvení indikátoru do lososově růžové. Titruje se oproti 40 ml acetonu jako blanku.

Ampule je třeba rozbít a odebrat alikvót o obsahu asi 25 mg účinné látky a přenést je do dělicí nálevky. Poté jsou přidány 2 ml 0,2 mol/l hydroxidu draselného a obsah je čtyřikrát vytřepán 20 ml hexanu. Do spojených hexanových extraktů je přidáno 40 ml acetonu, 3 kapky methylové červeně jako indikátoru a extrakty jsou ztitrovány kyselinou chloristou v dioxanu, z oranžového zbarvení indikátoru do lososově růžové. Barva přechodu má však světlejší odstíny. Opět je titrováno oproti blanku, který se sestává z 80 ml hexanu v 40 ml acetonu.

Čípky je třeba rozpustit v 40 ml horkého acetonu, poté jsou přidány 3 kapky methylové červeně jako indikátoru a roztoky jsou ztitrovány kyselinou chloristou v dioxanu. Konec titrace značí opět přechod z oranžové do lososově růžové. Titruje se oproti 40 ml acetonu jako blanku [27].

Stanovení chlorpromazinu gravimetricky

Další metodou pro stanovení chlorpromazinu v lékových přípravcích, navrženou již v 50. letech minulého století, je gravimetrie. Tablety je třeba rozetřít a rozpustit v acetonu. Poté zfiltrovat a promýt nezbytným množstvím acetonu. Filtrát je třeba odpařit a rozpustit ve 20 ml vody s 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Finální sraženinu je třeba promýt 20 ml chloroformu a 40 ml vody.

Ampule je třeba prvně zalkalizovat přídatkem 2 ml 0,2 mol/l hydroxidu draselného a poté je vytřepat čtyřikrát 20 ml hexanu. Hexanovou fází je poté třeba vyextrahovat dvakrát 10 ml vody obsahujícími 0,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Sraženinu je třeba promýt 40 ml vody.

Čípky jsou rozpuštěny v 15 ml hexanu a dvakrát vyextrahovány 10 ml vody s 0,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Kyselé extrakty jsou spojeny a ponechány srážet. Sraženina je promyta 20 ml hexanu a 50 ml vody [27].

2.2.4 Přípravek Plegomazin

Jedná se o injekční roztok určený k intramuskulárnímu podání s koncentrací hydrochloridu chlorpromazinu 25 mg/5 ml. Je určen pro léčení stavu motorického a psychického neklidu u dospělých, zejména při léčbě schizofrenie či při zvládání manických fází bipolární afektivní poruchy. Pro běžné dávkování je doporučeno podávat třikrát denně 25 mg, u těžkých psychiatrických stavů je možno dávku navýšit až na třikrát denně 200 mg. Mezi velmi časté negativní účinky se řadí zvýšení tělesné hmotnosti, celkový útlum, sucho v ústech a zácpa. Přípravek není doporučen pro léčbu kojících žen. Plegomazin vyrábí firma EGIS Pharmaceuticals PLC (Budapešť, Maďarsko) [20].

3 Experimentální část

3.1 Reagencie

Studovanou látkou byl chlorpromazin hydrochlorid v čistotě $\geq 98\%$ od firmy Sigma-Aldrich, Praha. Byl připraven zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l navážením 0,1776 g chlorpromazinu a kvantitativním převedením deionizovanou vodou do 50ml odměrné baňky. Z tohoto zásobního roztoku byly ředěním připraveny roztoky o následujících koncentracích: 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, 2 a 1 $\mu\text{mol/l}$, pH těchto kalibračních roztoků bylo upraveno na hodnotu 6 pomocí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru.

Kyselá složka BR pufru byla připravena smícháním 2,69 ml 85% kyseliny fosforečné (p.a., Lach-Ner, Neratovice), 2,27 ml 99% octové kyseliny (p.a., Ing. Petr Švec, Penta, Praha), rozpuštěním 2,75 g kyseliny borité (p.a., Lachema, Brno) a doplněním deionizovanou vodou na objem 1 litr. Vzniklý roztok o koncentraci 0,04 mol/l byl uchováván v tmavé skleněné zásobní lahvi. Zásaditá složka BR pufru byla připravena rozpuštěním 8,0 g pevného hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) v 1 litru deionizované vody. Takto vzniklý roztok hydroxidu sodného má koncentraci 0,2 mol/l a byl uchováván ve tmavé skleněné lahvi. BR pufr o příslušném pH byl připraven smísením jeho zásadité a kyselé složky. Dalšími použitými chemikáliemi byly hexakynoželeznatan draselný (p.a., Lachema, Brno), chlorid draselný (p.a., Lach-Ner, Neratovice) a deionizovaná voda (Millipore Milli-Q Plus System, Millipore, USA).

3.2 Instrumentace

Pro stanovení byla použita sestava BIASPE02 (DropSens, Španělsko) sestávající se z cely (DropSens, Španělsko) a programovatelné elektronické pipety Gilson PIPETMAN M (Gilson, USA). Pro nastavení pipety byl použit software Pippeting Mode Builder (Gilson, USA), pro záznam měření byl použit software NOVA 1.11 (Metrohm AUTOLAB, Nizozemí). Software pracoval v operačním systému Windows 10 (Microsoft Corporation, USA). Dále byl použit potenciostat AUTOLAB PGSTAT 10 (Metrohm AUTOLAB, Nizozemí). Všechna měření probíhala v tříelektrodevém zapojení na sítotiskové uhlíkové elektrodě DRP-110 (DropSens, Španělsko). Spektrofotometrická stanovení byla provedena na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA) s ovládacím programem UV-Visible ChemStation (ver. 9.01) v křemenných kyvetách o tloušťce 1,0 cm.

Přesná hodnota pH byla měřena na digitálním pH-metru Jenway 3510 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). Přístroj byl kalibrován pomocí standardních kalibračních pufrů.

3.3 Vyhodnocení dat

Výsledkem každého individuálního měření je pík. Pomocí software NOVA 1.11 byla spočtena výška každého píku a po integraci byla také zjištěna jeho plocha. Takto získané hodnoty byly zprůměrovány.

3.4 Výpočet mezi stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti byla spočtena dle následujícího vztahu:

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{s}$$

kde σ je směrodatná odchylka deseti stanovení analytu o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu kalibrační přímky a s je směrnice příslušné kalibrační přímky.

3.5 Výpočet výtěžnosti

Výtěžnost byla spočtena dle následujícího vztahu:

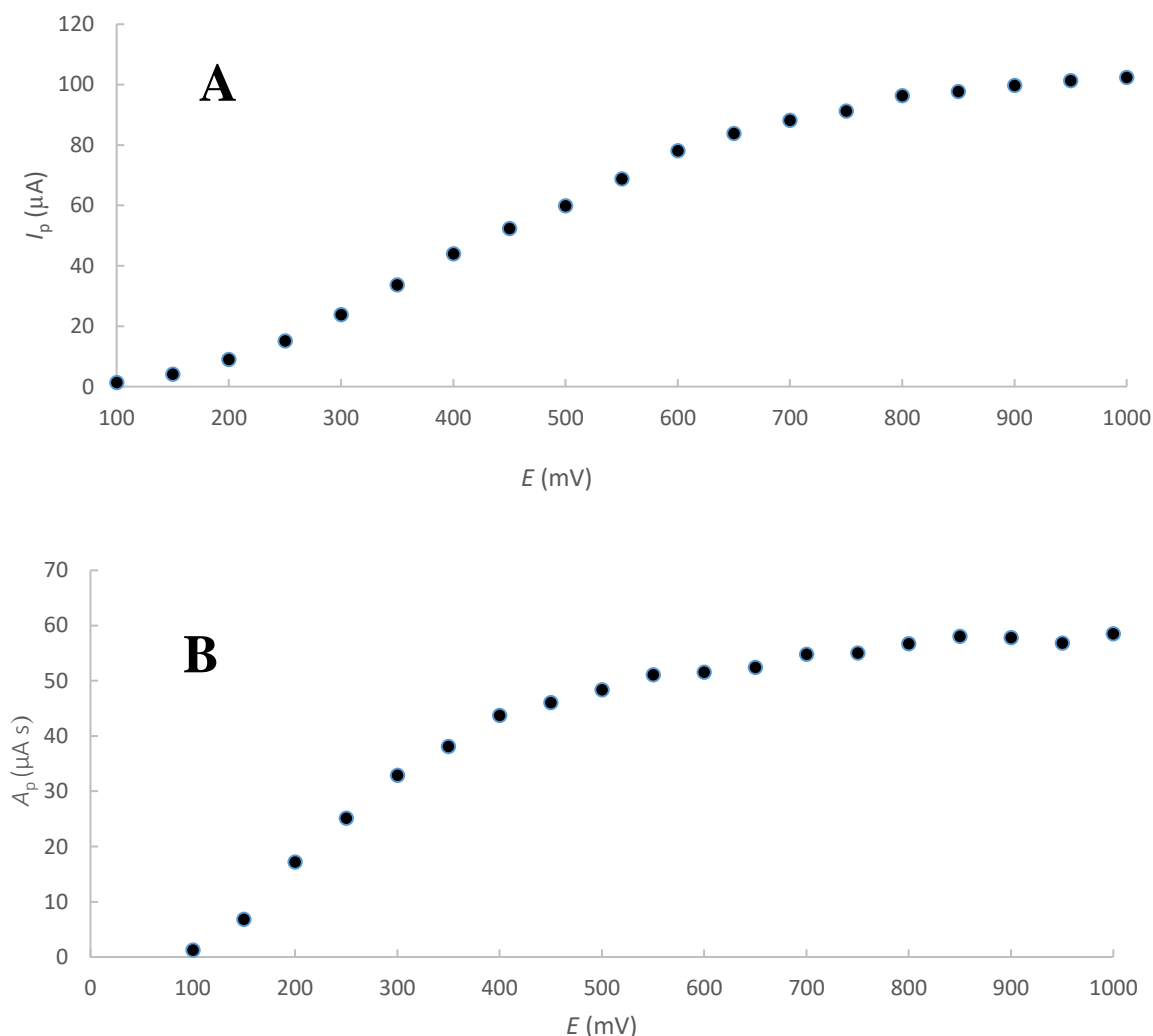
$$výtěžnost = \frac{c}{c_{ref}} \cdot 100 \%$$

kde c je koncentrace zjištěná konkrétní analytickou metodou a c_{ref} je referenční hodnota koncentrace.

4 Stanovení hexakyanoželeznatanu draselného

4.1 Výběr vhodných podmínek pro stanovení

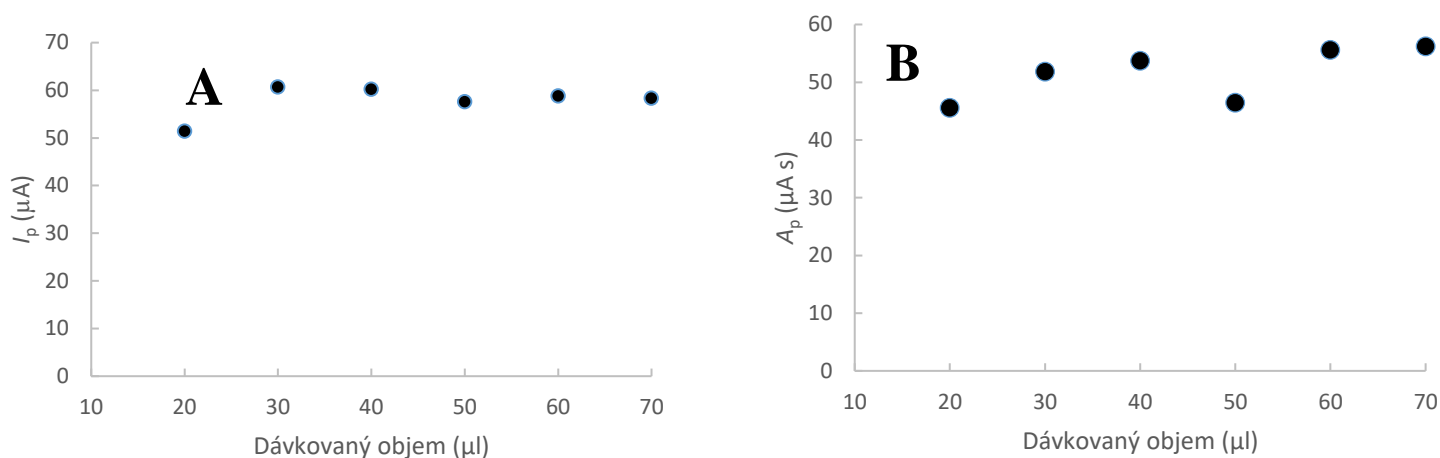
První z podmínek pro optimalizaci je hodnota vkládaného detekčního potenciálu pro stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l hexakyanoželeznatanu draselného v 0,1 mol/l chloridu draselném. Postupně byly vkládány potenciály 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 a 1000 mV a byla zjišťována hodnota proudu odpovídající výšce píku a ploše píku. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4.1. Z těchto získaných hodnot byl vybrán potenciál 800 mV jako vhodný detekční potenciál pro stanovení.



Obrázek 4.1 - Výběr vhodného detekčního potenciálu z (A) proudu píku (I_p) a (B) plochy píku (A_p) pro stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l hexakyanoželeznatanu draselného v 0,1 mol/l chloridu draselném (rychlost dávkování 5, dávkovaný objem 40 μl)

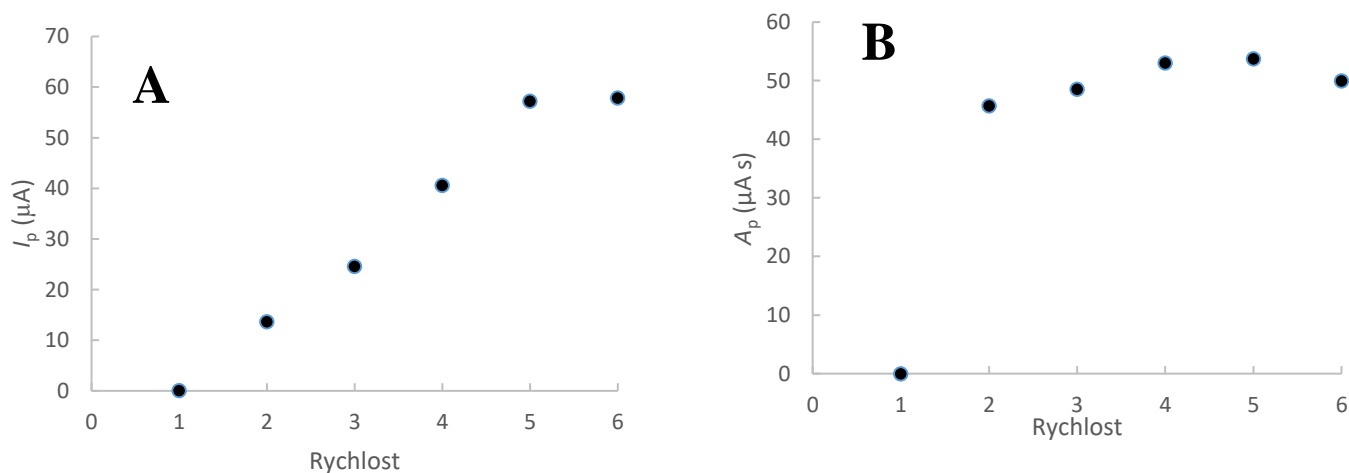
Další podmínky stanovení souvisí s nastavením elektronické pipety. Jedná se o dávkovaný objem. Bylo nastaveno dávkování 20, 30, 40, 50, 60 a 70 μl a měřen procházející proud. Výsledky měření jsou uvedeny na obr. 4.2. Z takto získaných hodnot byl vybrán optimální

objem 40 μl , neboť maximální objem špičky pipety je 200 μl , tudíž z jednoho nasátí lze mít výsledky 5 měření.



Obrázek 4.2 - Výběr vhodného dávkovaného objemu z (A) proudu piku (I_p) a (B) plochy piku (A_p) pro stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l hexakynoželznatanu draselného v 0,1 mol/l chloridu draselném (detekční potenciál 800 mV, rychlost dávkování 5)

Poslední z podmínek pro stanovení je rychlost dávkování. Na pipetě byla nastavena rychlost 1-6 a měřen procházející proud. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4.3. Z těchto hodnot byla zvolena jako optimální rychlost dávkování 5.



Obrázek 4.3 - Výběr vhodné rychlosti dávkování z (A) proudu piku (I_p) a (B) plochy piku (A_p) pro stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l hexakynoželznatanu draselného v 0,1 mol/l chloridu draselném (detekční potenciál 800 mV, dávkovaný objem 40 μl)

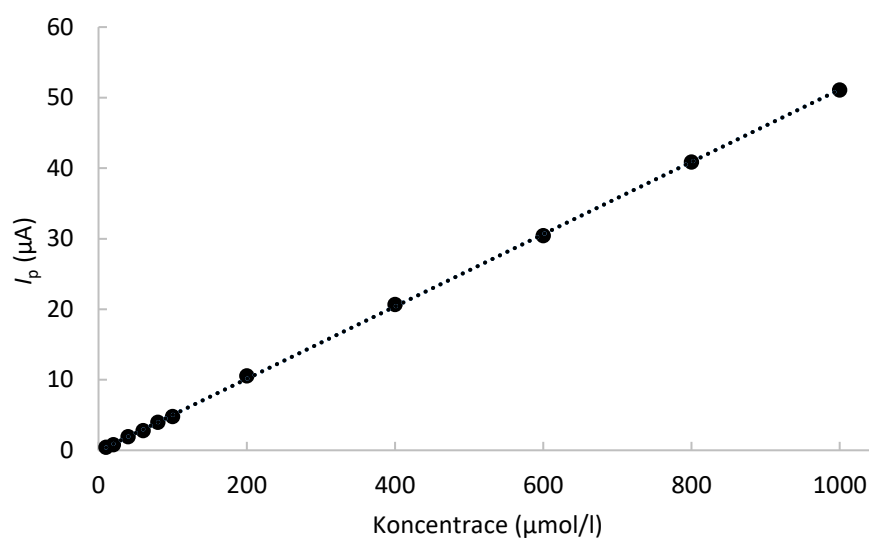
4.2 Kalibrační závislost

Po nalezení vhodných podmínek pro stanovení byla proměřena kalibrační závislost. Byly připraveny roztoky o následujících koncentracích: 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, 2 a 1 $\mu\text{mol/l}$ a byl změřen procházející proud. Výsledek je uveden na obr. 4.4 a

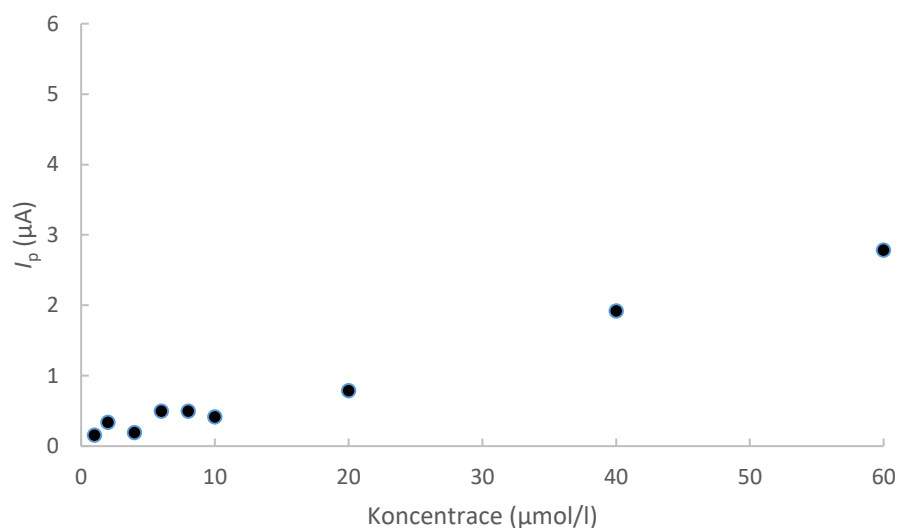
4.5. Z grafu 4.5 je patrné, že v nejnižším koncentračním řádu, tj. v rozsahu 1-10 $\mu\text{mol/l}$ není získaná závislost lineární, při vyšších koncentracích však již ano. Parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tab. 4.1.

Tabulka 4.1 - Parametry kalibrační přímky pro stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l hexakynoželeznatanu draselného v 0,1 mol/l chloridu draselném (detekční potenciál 800 mV, rychlost dávkování 5, dávkovaný objem 40 μl)

Směrnice (A l/mol)	Úsek (μA)	r^2	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)
0,0511	-0,146	0,9999	7,2



Obrázek 4.4 - Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci (1-1000 $\mu\text{mol/l}$) hexakynoželeznatanu draselného v 0,1 mol/l chloridu draselném (detekční potenciál 800 mV, rychlost dávkování 5, dávkovaný objem 40 μl)

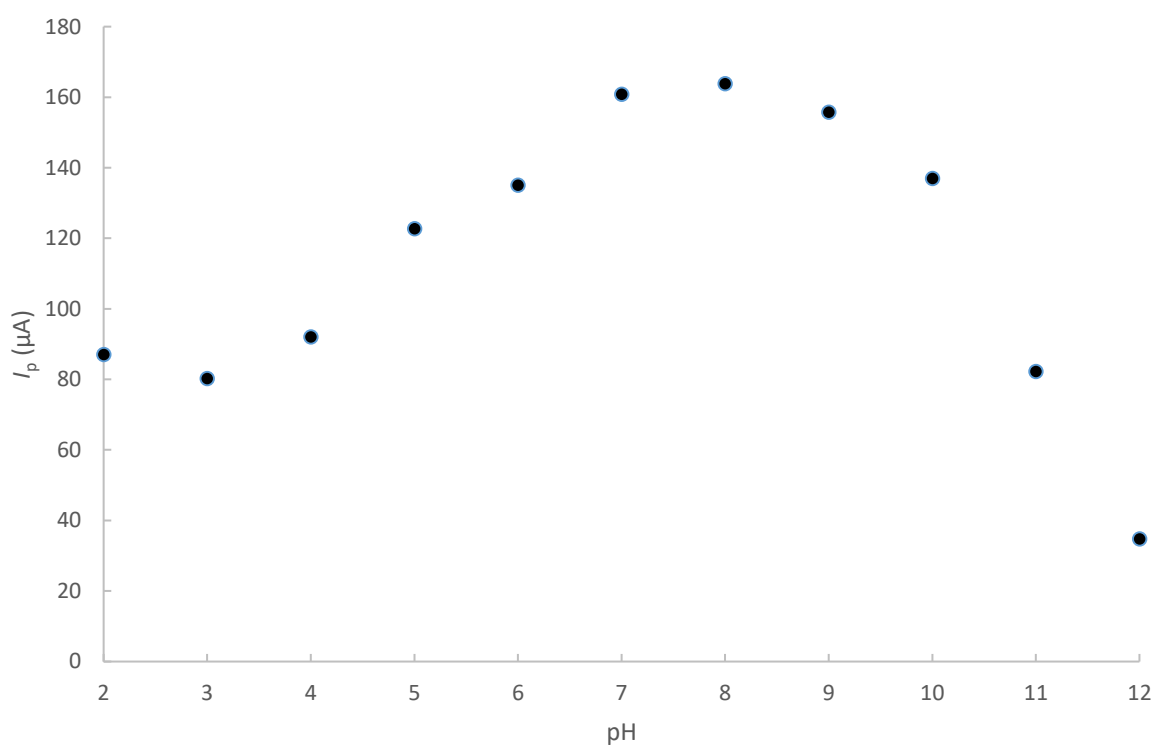


Obrázek 4.5 - Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci (1-60 $\mu\text{mol/l}$) hexakynoželeznatanu draselného v 0,1 mol/l chloridu draselném (detekční potenciál 800 mV, rychlost dávkování 5, dávkovaný objem 40 μl)

5 Stanovení chlorpromazinu

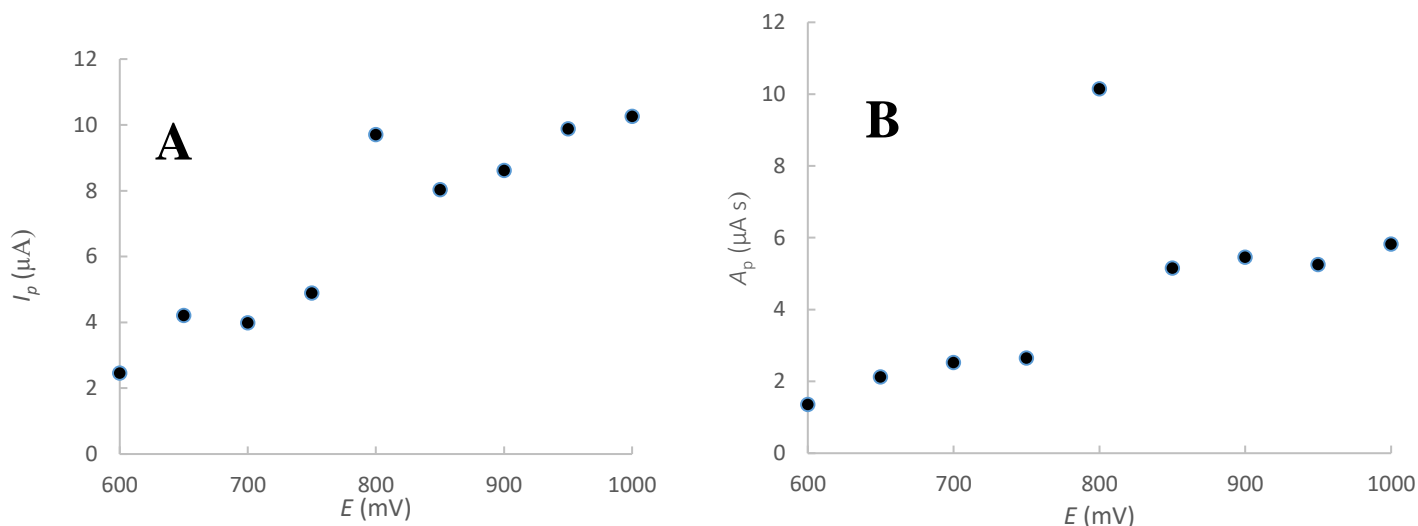
5.1 Výběr vhodných podmínek pro stanovení

První podmínkou pro stanovení chlorpromazinu je výběr vhodného pH. Pomocí Brittonova-Robinsonova pufru byly připraveny roztoky o hodnotě pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 a 12 a pomocí cyklické voltametrie (počáteční potenciál 0 mV, konečný potenciál 1200 mV, s krokem 5 mV a s rychlostí skenu 100 mV/s) byl měřen procházející proud roztokem $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l chlorpromazinu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 5.1. Z výsledků je patrné, že nejvyšší píky chlorpromazin poskytuje v prostředí o pH 8, avšak již při hodnotě pH 7 (a vyšší) se v roztoku objevily bílé krystaly, které znemožňují reprodukovatelné stanovení chlorpromazinu (pravděpodobně v důsledku hydrolýzy), tudíž byla vybrána jako optimální hodnota pH 6.



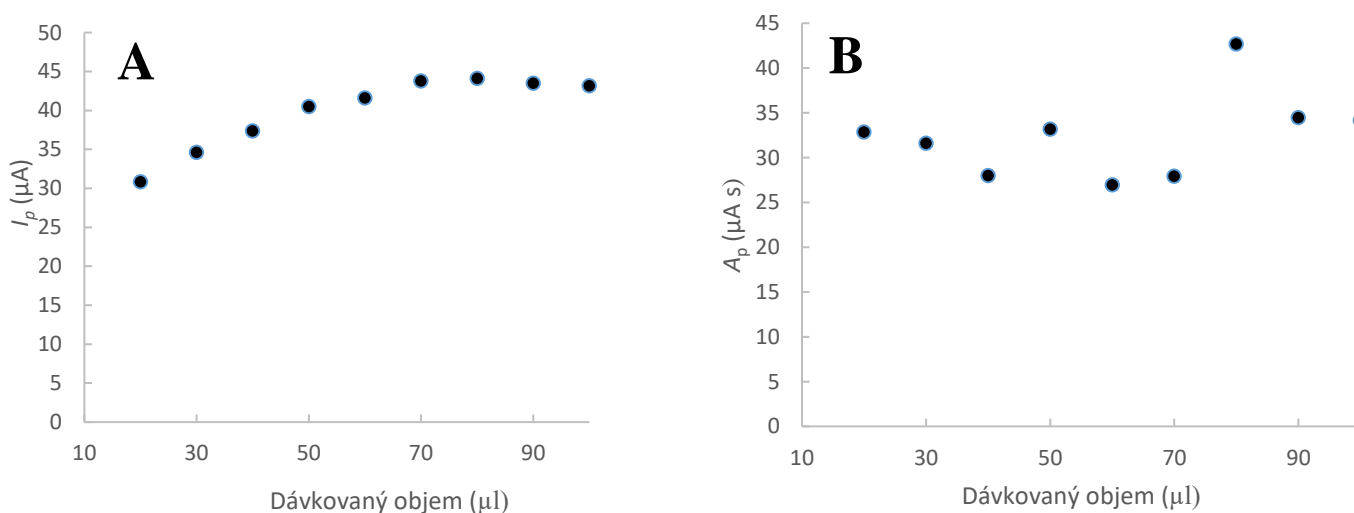
Obrázek 5.1 - Závislost proudu píku (I_p) na pH při stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l chlorpromazinu (detekční potenciál 700 mV, rychlost dávkování 6, dávkovaný objem 50 μ l)

Druhou podmínkou pro stanovení byl vkládaný detekční potenciál. Byl měřen průchod proudu v $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l roztoku chlorpromazinu při pH 6 při vkládaných potenciálech 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 a 1000 mV. Z měření byly vybrány hodnoty odpovídající výšce píku a jeho ploše. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4.2. Z těchto výsledků byla vybrána hodnota 700 mV jako potenciál vhodný pro stanovení.



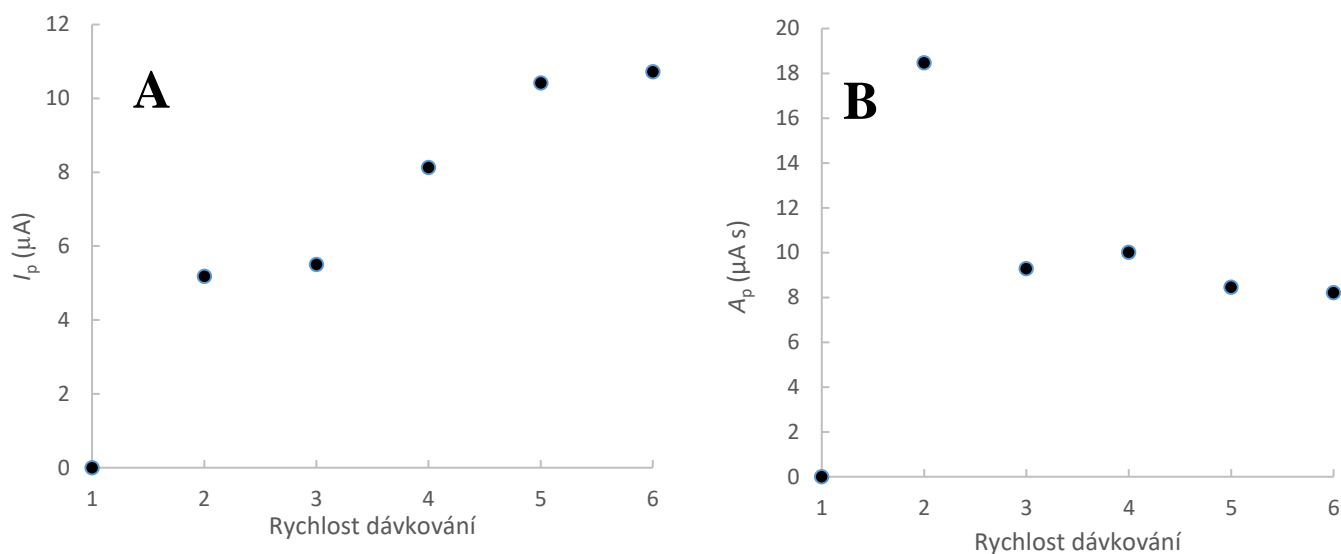
Obrázek 5.2 - Závislost (A) proudu píku (I_p) a (B) plochy píku (A_p) na vkládaném potenciálu při stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l chlorpromazinu (rychlost dávkování 6, dávkovaný objem 50 μl , pH 6)

Další podmínky souvisí s nastavením pipety. Bylo nastaveno dávkování 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 a 100 μl a měřen procházející proud. Výsledky měření jsou uvedeny na obr. 5.3. Z takto získaných hodnot byl vybrán objem 50 μl jako optimální, a to ze stejného důvodu, který je uveden v předchozí kapitole.



Obrázek 5.3 - Závislost (A) proudu píku (I_p) a (B) plochy píku (A_p) na dávkovaném objemu při stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l chlorpromazinu (detekční potenciál 700 mV, rychlost dávkování 6, pH 6)

Poslední z podmínek pro stanovení je rychlost dávkování. Na pipetě byla nastavena rychlost 1-6 a měřen procházející proud. Výsledky jsou uvedeny na obr. 5.4. Z těchto hodnot byla zvolena optimální rychlost dávkování 6.



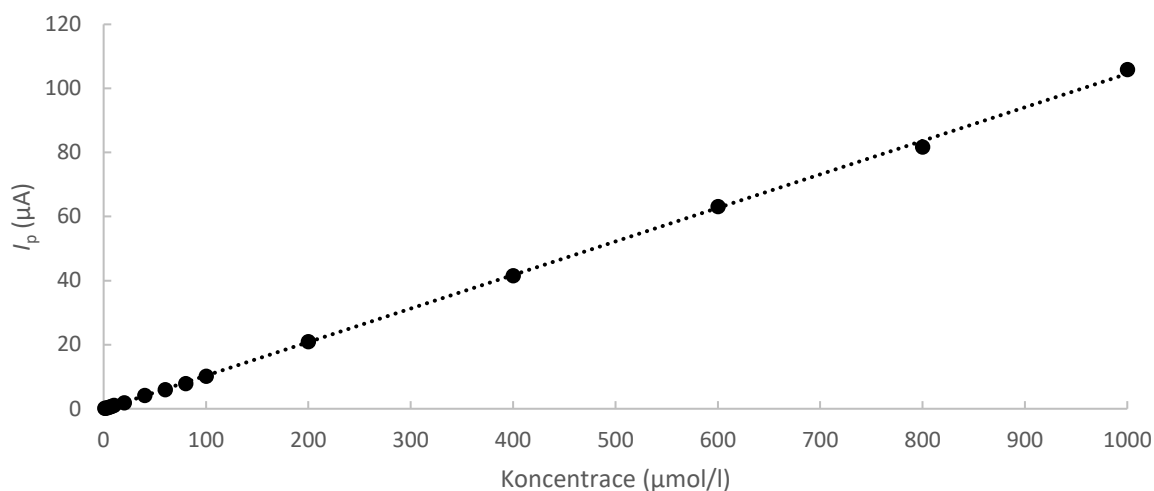
Obrázek 5.4 – Závislost (A) proudu píku (I_p) a (B) plochy píku (A_p) na rychlosti dávkování elektronické pipety při stanovení $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l chlorpromazinu (detekční potenciál 700 mV, dávkovaný objem 50 μ l, pH 6)

5.2 Kalibrační závislost

Po nalezení vhodných podmínek pro stanovení byla proměřena kalibrační závislost. Byly připraveny roztoky o následujících koncentracích: 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, 2 a 1 μ mol/l, pH roztoků bylo upraveno BR pufrém na hodnotu 6 a baňky s roztoky byly zabaleny do alobalu. Následně byl proměřen procházející proud. Výsledek je uveden na obr. 5.5. Tato metoda poskytuje lineární odezvu v celém rozsahu uvedených koncentrací a poskytuje spolehlivé výsledky. Parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tab. 5.1.

Tabulka 5.1 - Parametry kalibrační závislosti pro stanovení chlorpromazinu pomocí BIA (detekční potenciál 700 mV, rychlost dávkování 6, dávkovaný objem 50 μ l, pH 6)

Směrnice (A l/mol)	Úsek (μA)	r^2	LOQ (μ mol/l)
0,10	-0,13	0,9996	2,7

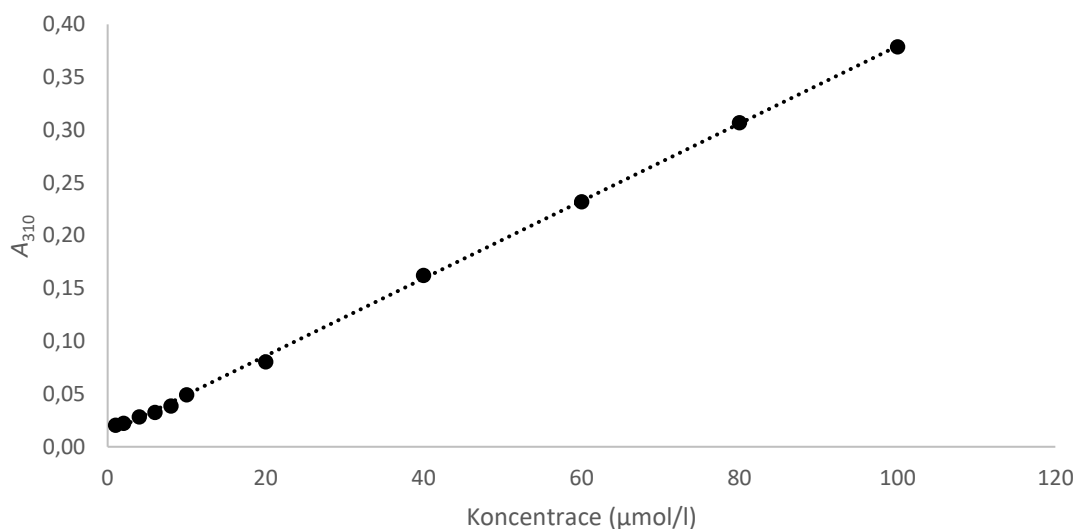


Obrázek 5.5 - Závislost proudu píku (I_p) na koncentraci chlorpromazinu (pH 6, detekční potenciál 700 mV, rychlost dávkování 6, dávkový objem 50 μl)

Kalibrační závislost byla také pro srovnání proměřena pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Byla proměřena absorbance roztoků o koncentracích 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, 2 a 1 μmol/l. Vlnová délka byla vybrána z dostupného spektra [29] v maximu, které odpovídá 310 nm. Výsledky jsou uvedeny na obr. 5.6. I tato závislost je lineární v celém rozsahu koncentrací. Parametry kalibrační závislosti jsou uvedeny v tab. 5.2.

Tabulka 5.2 - Parametry kalibrační závislosti získané pomocí UV-VIS (detekční vlnová délka 310 nm, optická dráha 1,0 cm, pH 6)

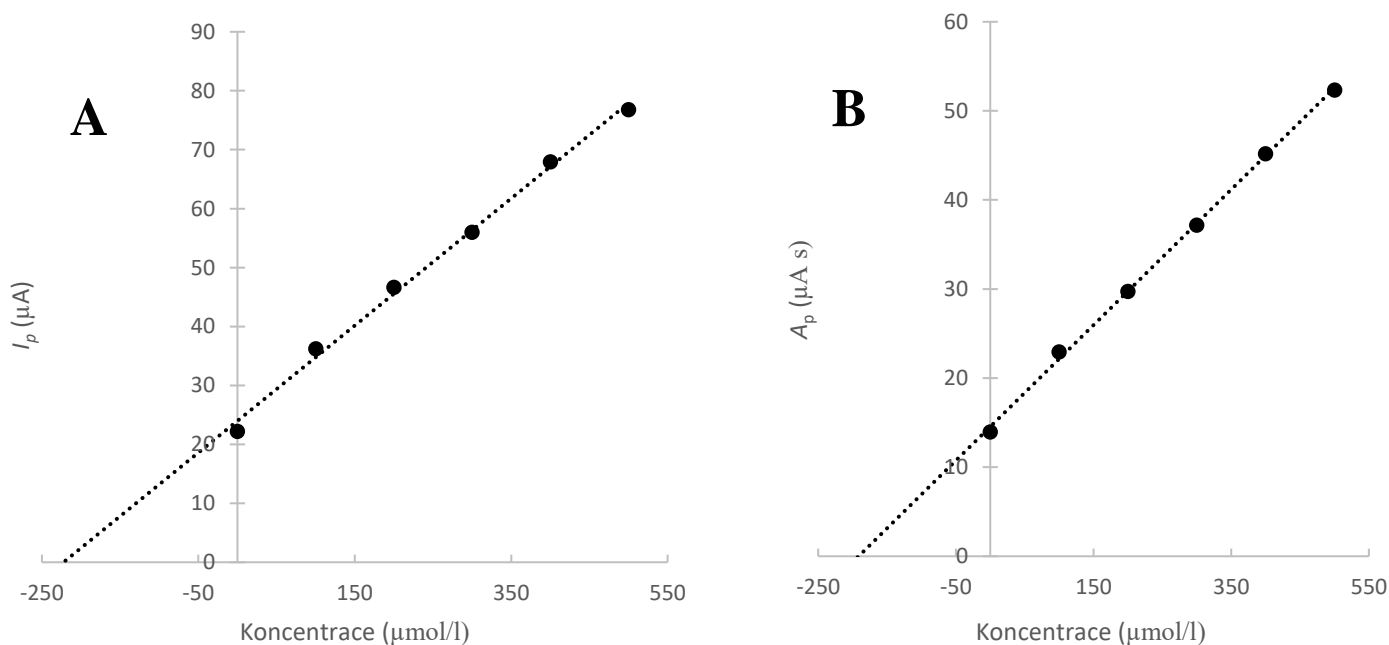
Směrnice (l/mol)	Úsek	r^2	LOQ (μmol/l)
3700	0,0127	0,9995	0,82



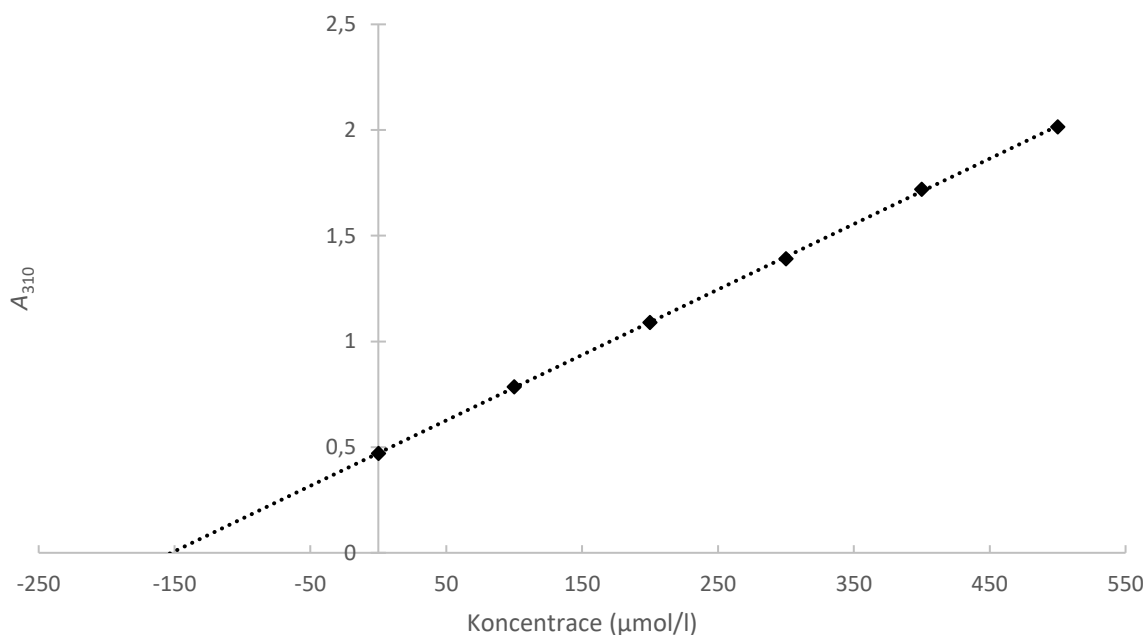
Obrázek 5.6 - Závislost absorbance (A) na koncentraci chlorpromazinu při pH 6

5.3 Stanovení chlorpromazinu v přípravku Plegomazin

Chlorpromazin byl stanoven pomocí metody standardního přídávku v podmínkách, které byly nalezeny v kapitole 5.1. Do 10ml odměrných baněk bylo pipetováno 100 μ l přípravku (infuzního roztoku) a poté 0, 100, 200, 300, 400 a 500 μ l standardu chlorpromazinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol/l. Výsledky jsou uvedeny na obr. 5.7 a 5.8.



Obrázek 5.7 - Stanovení chlorpromazinu v léčivu Plegomazin pomocí BIA z (A) proudu píku (I_a) a (B) plochy píku (A_p) (pH 6, detekční potenciál 700 mV, rychlost dávkování 6 a dávkovaný objem 50 μ l)



Obrázek 5.8 - Stanovení chlorpromazinu v léčivu Plegomazin pomocí UV-VIS spektrofotometrie (detekční vlnová délka 310 nm, optická dráha 1,0 cm, pH 6)

Z grafu 5.7 byla spočtena koncentrace chlorpromazinu v přípravku Plegomazin, která odpovídá 200 $\mu\text{mol/l}$ při výpočtu z výšky píku a 175 $\mu\text{mol/l}$ při výpočtu z plochy píku. Z grafu 5.8 byla spočtena koncentrace 152 $\mu\text{mol/l}$. Koncentrace deklarovaná výrobcem je 141 $\mu\text{mol/l}$. Jako přesnější se ke stanovení jeví metoda UV-VIS při vlnové délce 310 nm. Porovnání výsledků a hodnot výtěžnosti jsou uvedeny v tab. 5.3.

Tabulka 5.3 - Porovnání výsledků stanovení chlorpromazinu v přípravku Plegomazin různými metodami

Metoda	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace (mg / 5 ml)	Výtěžnost (%)
Výrobce deklaruje	141	25	100
BIA- I_p	200	35	140
BIA- A_p	175	31	124
UV-VIS	152	27	108

6 Závěr

Byla ověřena možnost použití vsádkové injekční analýzy (BIA) pro stanovení chlorpromazinu. Při stanovení modelové látky hexakynožeželnatanu draselného, který byl použit pro otestování celého elektrochemického systému, poskytuje ampérometrická metoda (detekční potenciál 800 mV, rychlost dávkování 5, dávkovaný objem 40 μl) lineární odezvu v oblasti koncentrací 10-1000 $\mu\text{mol/l}$ a mez stanovitelnosti je 7,2 $\mu\text{mol/l}$. Poté byla vyvinuta metoda pro stanovení chlorpromazinu (pH 6, detekční potenciál 700 mV, rychlost dávkování 6, dávkovaný objem 50 μl), která poskytuje lineární odezvu v celé proměřované oblasti koncentrací 1-1000 $\mu\text{mol/l}$ a jejíž mez stanovitelnosti je 2,7 $\mu\text{mol/l}$. V poslední části práce byl stanoven obsah chlorpromazinu v léčivu Plegomazin, kde byly spočteny koncentrace 200 $\mu\text{mol/l}$ při výpočtu z proudu píku, 175 $\mu\text{mol/l}$ při výpočtu z plochy píku a 152 $\mu\text{mol/l}$ z výsledků, které poskytla UV-VIS spektrofotometrie. Hodnota udávaná výrobcem je 141 $\mu\text{mol/l}$. Jako vhodnější metoda se ukazuje spektrofotometrie, neboť poskytuje výsledky bližší koncentraci deklarované výrobcem. V tab. 6.1 jsou pro srovnání uvedeny vybrané elektrochemické metody pro stanovení chlorpromazinu.

Tabulka 6.1 - Srovnání vybraných elektrochemických metod pro stanovení chlorpromazinu

Technika	Elektroda	Prostředí	LOQ (mol/l)
DPSV [23]	GCE	BR pufr pH 9	$1,32 \cdot 10^{-7}$
DPV [26]	modifikovaná CPE	BR pufr pH 4	$5,3 \cdot 10^{-9}$
Ampérometrie [28]	SCE	Fosfátový pufr pH 2,9	$5 \cdot 10^{-7}$
BIA	SCE	BR pufr pH 6	$2,7 \cdot 10^{-6}$

7 Použitá literatura

- [1] WANG J., TAHA Z.: Batch Injection Analysis. *Analytical Chemistry*, 1991, 63, 1053-1056.
- [2] QUINTINO M. S. M., ANGNES L.: Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. *Electroanalysis*, 2004, 16, 513-523.
- [3] ROCHA D. P., CARDOSO R. M. et al.: Batch-Injection Analysis Better than Ever: New Materials for Improved Electrochemical Detection and On-Site Applications. *Electroanalysis* [online]. DOI: 10.1002/elan.201800042.
- [4] TORMIN T. F., CUNHA R. R. et al.: Combination of Screen-Printed Electrodes and Batch Injection Analysis: A Simple, Robust, High-Throughput, and Portable Electrochemical System. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 202, 93-98.
- [5] WANG J., TAHA Z.: Batch Injection Analysis Using Fiber-Optic Fluorometric Detection. *Applied Spectroscopy*, 1992, 46, 107-110.
- [6] WANG J., ANGNES L.: Batch Injection Spectroscopy. *Analytical Letters*, 1993, 26, 2329-2339.
- [7] LU J., CHEN Q., DIAMOND D., WANG J.: Inverted Poly(Vinyl Chloride)–Liquid Membrane Ion-Selective Electrodes for High-Speed Batch Injection Potentiometric Analysis. *Analyst*, 1993, 118, 1131-1135.
- [8] FERNANDES J. C., GARCIA C. A. et al.: Determination of Acetylsalicylic Acid in Tablets with Salicylate Ion Selective Electrode in a Batch Injection Analysis System. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 1998, 9, 249-251.
- [9] VLASOV Y. G. , ERMOLENKO Y. E. et al.: A Mercury Sensor For Flow- and Batch-Injection Analyses. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1995, 24, 317-319.
- [10] BRETT C. M., BRETT O. et al.: Amperometric and Voltammetric Detection in Batch Injection Analysis. *Analytical Chemistry*, 1994, 66, 3145-3150.
- [11] WANG J., LU J. et al.: Batch Injection Stripping Voltammetry of Trace Metals. *Analytica Chimica Acta*, 1992, 259, 123-128.

- [12] BRETT C. M., BRETT O. et al.: Amperometric Batch Injection Analysis: Theoretical Aspects of Current Transients and Comparison with Wall-Jet Electrodes in Continuous Flow. *Electroanalysis*, 1995, 7, 225-229.
- [13] BRETT C. M., INZELT G. et al.: Poly(Methylene Blue) Modified Electrode Sensor for Haemoglobin. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 385, 119-123.
- [14] DA SILVA R. A., GIMENES D. T. et al.: Batch Injection Analysis with Amperometric Detection: Application for Simultaneous Analysis Using a Single Working Electrode. *Analytical Methods*, 2011, 3, 2804-2808.
- [15] http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Phenothiazine,MDA_CHEM-820975?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cz%2F&bd=1, stav ke dni 9.4.2018.
- [16] BUREŠOVÁ, H.: Cyklická voltametrie jako detekční technika ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Diplomová práce, PřF UK, Praha 2014.
- [17] <https://cs.wikipedia.org/wiki/Chlorpromazin#/media/File:Chlorpromazin.svg>, stav ke dni 9.4.2018.
- [18] NESMĚRÁK K., ČERVENÝ V. et al.: A Spectrofluorimetric Determination of Phenothiazine Derivatives after Their Photooxidation or Chemical or Electrochemical Oxidation in a Flow Injection Arrangement. *Microchemical Journal*, 2013, 106, 226-232.
- [19] DOLEŽAL, M.: Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. Karolinum, Praha 2013 (ISBN 978-80-246-2382-5).
- [20] http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Chlorpromazini_hydrochloridum.htm, stav ke dni 30.4.2018.
- [21] FASANMADE A. A., FELL A. F.: Determination of Chlorpromazine and Its Sulphoxide in Pharmaceutical Dosage Forms by Third-Order Derivative Ultraviolet Spectroscopy. *Analyst*, 1985, 110, 1117-1124.
- [22] KLIMEŠ, J.: Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. 2. vydání. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015 (ISBN 978-80-260-8175-3).

- [23] NI Y., WANG L., KOKOT S.: Voltammetric Determination of Chlorpromazine Hydrochloride and Promethazine Hydrochloride with the Use of Multivariate Calibration. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 439, 159-168.
- [24] ORTUÑO J., GIL A. et al.: Flow-Injection Coulometric Detection Based on Ion Transfer and Its Application to the Determination of Chlorpromazine. *Sensors*, 2008, 8, 3678-3688.
- [25] KIRCHHERR H., KUHNVELTEN W.: Quantitative Determination of Forty-Eight Antidepressants and Antipsychotics in Human Serum by HPLC Tandem Mass Spectrometry: A Multi-Level, Single-Sample Approach. *Journal of Chromatography B*, 2006, 843, 100-113.
- [26] TAVAKKOLI N. SOLTANI N. et al.: New Carbon Paste Electrode Modified with Graphene/TiO₂/V₂O₅ for Electrochemical Measurement of Chlorpromazine Hydrochloride. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2018, 83, 50-58.
- [27] MILNE, J. B., CHATTEN L.: Analysis of Promazine and Chlorpromazine in Pharmaceutical Preparations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1957, 9, 686-690.
- [28] KRUK J., TORBICZ W.: Screen-Printing-Fabricated Amperometric Sensors for Determination of the Neuroleptic Chlorpromazine. *Elektronika*, 2006, 47, 12, 61-62.
- [29] <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C50533&Mask=400#UV-Vis-Spec>, stav ke dni 17. 5. 2018.